

【書類名】 明細書

【発明の名称】 遺伝子のスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片に特異的にハイブリダイズするプローブを使用して、生体組織または細胞試料の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、前記組織または細胞における前記 mRNA および／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べることにより、遺伝子のスクリーニングを行う方法。

【請求項 2】 遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片が、培養細胞または組織において発現しているものである請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片が、DNA チップまたは DNA マイクロアレーにより発現が確認されたものである請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片が、ある事象に対して発現量の変化したものである請求項 1～3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】 遺伝子および／または発現遺伝子配列断片がクローン化されているが、機能未知のものである請求項 1～4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】 1 回のスクリーニングにより、1 種類の同じ組織または細胞における、少なくとも 2 種類の異なる前記 mRNA および／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べる請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】 1 回のスクリーニングにより、少なくとも 2 種類の異なる組織または細胞における、1 種類の前記 mRNA または発現遺伝子配列断片の局在化を調べる請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】 薬剤として有効な物質をコードする遺伝子をスクリーニングするために用いられる請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】 疾患に関連する遺伝子をスクリーニングするために用いられる請求項 1～7 のいずれかに記載の方法。

【請求項10】 クローン化されているが、機能未知の遺伝子または発現遺伝子配列断片の機能を調べるために用いられる請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 ある事象が起こる前および起こった後の生体からそれぞれ組織または細胞試料を採取し、該試料について、遺伝子の発現産物であるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片に特異的にハイブリダイズするプローブを使用してin situ ハイブリダイゼーションを行い、前記組織または細胞における前記mRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化の変化を調べることにより、遺伝子発現をモニタリングする方法。

【請求項12】 ある事象が起こった後の少なくとも2つの異なる時点で生体から組織または細胞試料を採取する請求項11記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

最近、ヒトゲノム解析の大枠も発表され、研究の関心は、ゲノムDNAの配列情報を解析するゲノム解析から、遺伝子の発現を解析するExpression (Functional) analysisに移ってきている。現在のところ、発現遺伝子配列断片(EST)を含め、発現遺伝子の中で、その配列が既知であっても、機能がわかっているものは少ない。

【0003】

遺伝子発現解析には、大量の試料について高速に効率よく解析を行う技術（ハイスループット技術）が必要である。DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術は、一つの細胞内での数万個の遺伝子の発現情報を提供することができ、遺伝子発現解析の実験をハイスループット化することに成功している。

【0004】

例えば、DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術を用いることにより、病態

の変化に伴って発現量の変化する遺伝子を同定することができる。発現レベルが、患者の予後と相関の高い遺伝子を見つければ、その遺伝子の発現情報を創薬の有効性の指標として利用することができる。

#### 【0005】

しかし、DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術によって得られる発現情報は、薬の有効性の予測までを可能にするものではない。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術から得られる遺伝子発現情報とは異なる発現情報に基づいて、遺伝子のスクリーニングを行う方法を提供することを目的とする。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術によって、ある遺伝子の個々の細胞における発現の有無や発現量がわかっていても、その情報がすぐに創薬につながるわけではない。本発明者は、生体組織または細胞における発現の局在化という観点から、クローン化されているが、機能がわからない多数の遺伝子または発現遺伝子配列断片の中から目的のものを絞り込むことができるのではないかと考えた。そして、*in situ* ハイブリダイゼーション法を利用して、生体組織における発現の局在化を調べることにより、目的とする遺伝子をスクリーニングする系を確立することに成功し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0008】

すなわち、本発明は、遺伝子の発現産物であるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片に特異的にハイブリダイズするプローブを使用して、生体組織または細胞試料の*in situ* ハイブリダイゼーションを行い、前記組織または細胞における前記mRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べることにより、遺伝子のスクリーニングを行う方法を提供する。

#### 【0009】

本発明の方法により、遺伝情報を担う構造単位としての遺伝子の他、断片的な

遺伝情報を担っているに過ぎない発現遺伝子配列断片 (Expression sequence tag, EST) をスクリーニングして、目的のものを絞り込むことができる。

#### 【0010】

本発明の方法において、遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片は、培養細胞または組織において発現しているものであってもよい。遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片は、DNA チップまたは DNA マイクロアレーにより発現が確認されたものであってもよい。また、遺伝子の発現産物である mRNA および／または発現遺伝子配列断片は、ある事象に対して発現量の変化したものであってもよい。

#### 【0011】

本明細書において、「事象」とは、生体の内部または外部に生じた何らかの変化をいい、この例としては、虚血、腫瘍、投薬などを挙げることができる。

#### 【0012】

本発明の方法において、遺伝子および／または発現遺伝子配列断片は、クローニングされているが、機能未知のものであってもよい。

#### 【0013】

本明細書において、「機能未知」または「機能がわからない」とは、物理化学的レベルの機能、生化学的レベルの機能または生理学的レベルの機能のいずれかが解析されていないことをいう。ここで、物理化学的レベルの機能とは、分子の相互作用に関する性質を含むものである。例えば、ある遺伝子がコードするタンパク質が DNA と結合する場合、その遺伝子は DNA 結合能を持つタンパク質をコードしていると言える（物理化学的レベルの機能）。生化学的レベルの機能とは、生化学的プロセスに関与する性質を含むものである。例えば、ある遺伝子がコードするタンパク質が、DNA の中でもある遺伝子のプロモーター領域に結合し、転写を活性化することがわかった場合、その遺伝子は転写活性化因子をコードしていると言える（生化学的レベルの機能）。生理学的レベルの機能とは、個体、組織または細胞における役割を含むものである。例えば、あるタンパク質をコードする遺伝子を破壊すると、前足のないマウスが生まれたとすると、このタンパク質は前足の分化に関与する機能を持つと言える（生理学的レベルの機能）。

**【0014】**

本発明の方法に従う1回のスクリーニングにより、1種類の同じ組織または細胞における、少なくとも2種類の異なるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べてもよい。本発明の方法に従う1回のスクリーニングによれば、1種類の同じ組織または細胞における、

例えば、2種類以上の異なるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べることができる。これには、プローブの蛍光波長を変えたり、2次抗体を変えたりすることにより、複数の染色を同時に行う技法（ダブルステイン、トリプルステイン、sky fishなど）を用いるとよい。

**【0015】**

あるいはまた、本発明の方法に従う1回のスクリーニングにより、少なくとも2種類の異なる組織または細胞における、1種類のmRNAまたは発現遺伝子配列断片の局在化を調べてもよい。本発明の方法に従う1回のスクリーニングによれば、例えば、2種類以上、好ましくは、10～20種類の異なる組織または細胞における、1種類のmRNAまたは発現遺伝子配列断片の局在化を調べることができる。

**【0016】**

本発明の方法は、薬剤として有効な物質をコードする遺伝子をスクリーニングするために用いることができる。例えば、ある遺伝子の発現が特定の部位に局在化することから、その組織、細胞内分布を考慮することで、その遺伝子の薬としての効果を推定することも可能となる。

**【0017】**

また、本発明の方法は、疾患に関連する遺伝子をスクリーニングするために用いることができる。例えば、病態モデル動物、トランスジェニック動物、ノックアウト動物などを用いると、プローブ局在と病因部位との対比により、より効果的に有力なプローブ選定を行うことができる。

**【0018】**

さらに、本発明の方法は、クローン化されているが、機能未知の遺伝子または発現遺伝子配列断片の機能を調べるために用いることができる。細胞内、組織内

、臓器別の局在を知ること、蛋白発現の分布が推定でき、より効率的にプローブのターゲッティングを行える。

#### 【0019】

また、本発明は、ある事象が起こる前および起こった後の生体からそれぞれ組織または細胞試料を採取し、該試料について、遺伝子の発現産物であるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片に特異的にハイブリダイズするプローブを使用してin situ ハイブリダイゼーションを行い、前記組織または細胞における前記mRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化の変化を調べることにより、遺伝子発現をモニタリングする方法を提供する。ある事象が起こった後の少なくとも2つの異なる時点で生体から組織または細胞試料を採取してもよい。

#### 【0020】

本発明の遺伝子スクリーニング方法は、生体組織または細胞における遺伝子および／または発現遺伝子配列断片の局在化という新たな観点から、遺伝子の選別を行うという画期的なものであり、目的とする遺伝子の絞り込みに有効である。

#### 【0021】

また、本発明の遺伝子スクリーニング方法は、上記のような形態学的な観点から遺伝子の選別を行うので、薬剤の研究・開発をより正しい方向に導くことができる。その結果、薬剤研究・開発にかかる労力と時間が短縮され、費用を少なくすることができる。

#### 【0022】

本発明の遺伝子発現のモニタリング方法は、疾患に関連する遺伝子の探索、クローン化した遺伝子またはESTの未知の機能の探索、ゲノム創薬などに利用することができる。

#### 【0023】

##### 【発明の実施の形態】

ゲノムワイドスクリーニングの後に、本発明の方法に従って、生体組織や細胞における局在化という観点からの大量スクリーニングを行うことで、目的とする遺伝子を絞り込むことができる。

#### 【0024】

虚血によるダメージを回復させるのに有効な薬剤を探索する場合を例として、より具体的に説明する。虚血モデルの動物において、虚血という事象の前後で発現量に差がある遺伝子をDNAマイクロアレーまたはDNAチップ（例えば、GeneChip™（米国アフィメトリックス社））で検出する（ゲノムワイドスクリーニング）。次いで、DNAマイクロアレーまたはDNAチップにより得られたデータとバイオインフォマテックスをリンクさせて、虚血という事象の前後で発現量に差がある遺伝子の配列情報を得る。その配列情報に基づいて、in situハイブリダイゼーションのためのプローブを設計し、作製する。その後、その遺伝子が、虚血の生じた臓器（例えば、脳、肝臓など）のどのような組織においてどのような分布をしているのかについて、in situハイブリダイゼーションで調べる。in situハイブリダイゼーションの操作は、手動でも自動でもよい。例えば、in situハイブリダイゼーションの完全自動化を実現するベンタナHXシステム（ベンタナ社）を利用することにより、短時間で再現性のよい結果を得ることができる。in situハイブリダイゼーションの結果から、薬剤の使用目的に適していると思われる組織分布を有する遺伝子を絞り込む。例えば、記憶の回復を目的とする薬剤を探索したい場合には、海馬に発現が局在している遺伝子を選択する。また、炎症を抑える薬剤を探索したい場合には、脳全体に発現が分布している遺伝子を選択する。

## 【0025】

以下に、DNAチップによる遺伝子発現解析とin situハイブリダイゼーションを組み合わせて、本発明を実施する態様について説明する。

### 1. DNAチップによる遺伝子発現解析

従来のプロッティング技術を利用し、アレイ状に配置された複数のプローブについて同時にハイブリダイゼーションを行い、解析を行う方法を、一般にアレイテクノロジーと呼んでいる（The chipping forecast. Nature Genetics, supplement vol. 21, (1999)）。このうち、プローブを直径1mm未満のアレイ状スポットとして作製した場合をマイクロアレイまたはチップと呼び、プローブがDNAで構成されているものを特に“DNAチップ”と呼ぶ。現在、このアレイテクノロジーを実用化した方法としては、フィルター上にcDNAをアレイ状にスポットしたもの

、スライドガラス上にcDNAや合成DNAをスポットしたもの、さらにGeneChip™（米国アフィメトリックス社）などがある（Lockhart, D.J. et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. Nature Biotechnology 14, 1675-80; Wodicka, L. et al. (1997) Genome-wide expression monitoring in *Saccharomyces cerevisiae*. Nature Biotechnology 15, 1359-67）。GeneChip™ではスポット技術が他のDNAチップとは異なっており、他の方法と区別するため、方法そのものを“GeneChip”という商標を冠して呼んでいる。GeneChip™では、ゲノムDNAの変異を解析するゲノム解析と、遺伝子の発現を解析する発現解析の両者が可能であるが、本発明においては、発現解析を行う。

#### 【0026】

##### 1. 1 原理と概略

GeneChip技術では他のDNAチップとはDNAプローブをチップ上にスポットする方法が異なっている。従来の方法では、直接生体より切り出したDNAプローブを基盤の上にスポットしていた。これに対してGeneChip技術では、DNAを18～25merの断片として、光化学反応を利用し、半導体製造技術に類似した工程で合成される。この結果、50または24  $\mu\text{m}$ 平方のプローブセル（これをタイルと呼ぶ）に、数百万個の18～25merの塩基配列をもったプローブが固定されている。

#### 【0027】

このようなチップ作製上の相違から、以下のような特性が生じる。

（1）18～25mer程度のプローブサイズでは、プローブ中央の一塩基を置き換えたミスマッチプローブは、ハイブリダイゼーションしにくいという現象があり（後藤雅式、他（1997）アフィニティセンサー-BIACOREによる遺伝子診断—原理と応用—臨床病理 45, 224-28）、これを利用して各タイルに配置されたプローブごとに、パーフェクトマッチとミスマッチ（プローブペア）の確認を行うことができる。このような操作により、ハイブリダイゼーション実験により得られた蛍光強度の信号から、非特異的な結合によって発生する擬陽性信号を排除でき、完全に一致した塩基配列を持つ真のプローブにより発生する信号量を正確に測定することができるシステムになっている（Lipshutz, R.J. et al. (1999) High de



nsity synthetic oligonucleotide arrays. Nature Genetics supplement, volume 21, January) )。さらに、プローブサイズとサンプルのサイズが短いことも手伝って、非特異的なハイブリダイゼーションばかりでなく、バックグラウンドシグナルの除去も可能となり、定量性を上げている。そして、合成されるオリゴヌクレオチドプローブのセットが

、目的とする遺伝子のコーディング領域、ユニークな塩基配列、またはハイブリダイズ能力などに基づいて決定されている。

この技術の延長線上で実用化されているのが、ゲノム突然変異解析である。この方法は、p53、HIV、P450、SNPチップなどで、一塩基配列の違いを解析するため、解析の対象部位の塩基にG、A、T、Cの4種類と、必要に応じてその部位を欠損させたプローブの計4～5種類のプローブセルを使用し、一塩基の違いを検出するという画期的なものである。

#### 【0028】

(2) GeneChip™は、チップ上のプローブとサンプルを結合させるハイブリダイゼーション・オープン、洗浄標識を行うFluidicステーション、蛍光発光を読み取るGene Array スキャナー、読み込んだ情報を処理解析するコンピューターシステムから構成されている。さらに、サンプル調製からデータ収集まで実験条件が、既存のキットを利用することで至適化されているため、再現性の高いデータを得ることができる。チップ上の数千の遺伝子の発現量を正確に定量するため、チップ上に大腸菌遺伝子用のプローブを配置し、大腸菌遺伝子由来のcRNAの一定量をサンプル中に混合してコントロールとすることにより（スパイキング）、サンプル中の遺伝子の定量性を高めると同時に、実験操作過程の精度をチェックすることができる。さらに、ハウスキーピング遺伝子のGAPDHやアクチンなどのプローブを利用した測定結果を合わせて利用することにより、複数の異なった実験結果の比較解析が行われ、ユーザーは、実験条件の検討などにわずらわされることなく、高感度で広いダイナミックレンジを有する、信頼性の高いデータを容易に得ることができる。

#### 【0029】

##### 1. 2 準備するもの

GeneChip™は、サンプル調製からデータ解析に至るまでの過程を包括したシステムであり、ほぼ完成されたものである。したがって、各ステップで使用する試薬やキットなどは、アフィメトリックス社の推奨する以下のものを使うことを勧める。

- ・全RNAの単離

TRIzol Reagent (Gibco BRL Life Technologies)

RNeasy Total RNA Isolation Kit (QIAGEN)

- ・Poly(A)<sup>+</sup>mRNAの単離

Oligotex Direct mRNA Kit (QIAGEN)

Oligotex mRNA Kit (QIAGEN)

- ・cDNA合成

Superscript Choice System (Gibco BRL Life Technologies)

T7-(dT)<sub>24</sub> Primer (GENSET Corp.)

- ・ビオチン標識化cRNAの合成(In Vitro Transcription, IVT)

RNA Transcript Labeling Kit (Enzo)

- ・IVT cRNA洗浄および定量

RNeasy Mini Kit (QIAGEN)

CHROMA SPIN-100 columns (CLONTECH)

- ・標識cRNAの断片化のためのバッファー

200 mM Tris-acetate, pH 8.1, 500 mM KOAc, 150 mM MgOAc

- ・内部標準物質 (Expression Control Clones)

pglbs-bioB, pglbs-bioC, pglbs-bioD, pglbs-cre

【0030】

### 1. 3 プロトコール

一連の操作は以下の通りである。

#### step1

サンプルから、約 2 μg のPoly (A)<sup>+</sup> mRNAを抽出する。

#### step2

逆転写酵素により、cDNAの合成を行う。

## step3

in vitro 転写により、ビオチン標識されたcRNAを量産し精製する。

## step4

標識cRNAをDNase処理または、マグネシウムイオン存在下で熱処理し、約50merのサイズに断片化する。

## step5

既知のインターナルスタンダード（スパイキング）をラベル後、標品に添加し、Chip に注入する。

## step6

オープン中でハイブリダイゼーションを行い、Fluidicステーション中で洗い標識を行う。

## step7

GeneArrayスキャナーでチップの情報を取り込む。

## step8

バイオインフォマティクス（生物学的情報処理）のシステムを用いてデータの処理・解析を行う。

【 0 0 3 1 】

#### 1. 4 バイオインフォマティクス

GeneChip™では大量のデータが得られるので、これを効率的に利用するため、いわゆるバイオインフォマティクス（Bioinformatics）技術が必要となる。このため、GeneChip™には、バイオインフォマティクス・ツールとして、独自のGeneChip Laboratory Information Management System (LIMS™) および GeneChip Expression Data Mining Tool (EDMT™) が併設され、データを遺伝子関連解析技術の標準化のためのオープンコンソーシアム（GATC）で定められた形式のSQL対応データベースへ出力し、インターネット上の公開遺伝子情報データベース（GenBankなど）とリンクすることを可能にしている。しかし、バイオインフォマティクス自体が発展途上にあるため、既存のシステムだけではデータ解析が不十分な場合がある。小中規模の研究施設においては、数人のデータベースを各々ファイリングし、個別に解析する必要性が生じてくるし、他の解析プログラムを使ってデ

ータを加工・グラフ化したり、統計計算を行う必要性も生じてくる。そこで、本発明者は、LIMS-SQLサーバーにアクセスし、EDMT類似のツールを用いてデータ加工することはもちろんであるが、個々のデータをGATC互換拡張データベースで保存し、Gene Spring（米国Silicon Genetics社）を用いてクラスタリング、図表化や検索を行い、さらに情報データベースサーチを行っている。また、統計計算や各々の遺伝子の機能的ヒエラルキー（階層化）を解析するためには、Stingray（米国アフィメトリックス社）を用いている。

### 【0032】

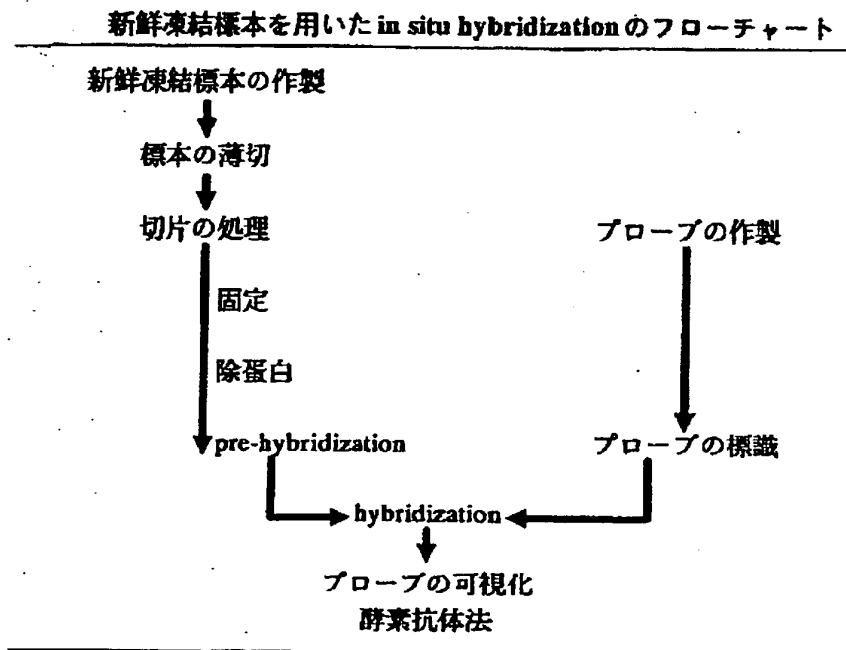
#### 2. in situハイブリダイゼーションによる発現遺伝子の局在化の検討

本発明者は、新鮮凍結切片を用いてin situ ハイブリダイゼーションを行った。新鮮凍結切片は、パラフィン固定組織や固定後包埋組織などの他の組織標本に比べ、最もシグナルが得やすいという長所がある。これは、プローブの組織内への浸透性が高いからである。

新鮮凍結標本を用いたin situ ハイブリダイゼーションのフローチャートを表1に示した。表1のフローチャートに従って、以下に説明を行う。

### 【0033】

【表 1】



## 【0034】

## 2. 1 新鮮凍結切片の作製

新鮮凍結切片は生の標本なので、RNaseの攻撃を受けやすく、実験を進める際には、いかにRNaseフリーの状態で行うか、組織のmRNAを保持することに一層の留意が必要である。

## 【0035】

## (1) 検体

実験動物からサンプル（例えば、脳、肝臓）を切り取る。清潔な滅菌シャーレに生理食塩水で湿らせたガーゼを置き、サンプルを包み乾燥を防ぐとよい。また、厚い被膜に覆われていたり、血管組織、間質組織が含まれていると薄切ができにくいことがあるため、これらを取り除いておくことが望ましい。

## 【0036】

## (2) 組織の包埋

包埋用のプラスチック製容器や円柱形に型どりしたアルミホイルの底に少量の OCT compound (Milles Lab製) を入れておく。その上に適当な大きさに切った組織を置き、組織が中央にくるように OCT compound を上から注入する。これらを、あらかじめドライアイスを入れておいたアセトンの中に漬けて、急速凍結する。凍結後、ドライアイスを入れたジャーに移し、組織の包埋処理が終わった後に、 $-80^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫で保存する。

【0037】

## (3) 組織の薄切

クリオスタットを用いて切片を  $10\mu\text{m}$  の大きさに薄切する。カッティング後、3-アミノプロピルトリエトキシシラン (ASP) コートのスライドガラスに付着させる。ASP コートのスライドガラスの作製法を表 2 に示す。

【0038】

【表 2】

表 2 APS コート・スライドガラスの作製法

- ① APS (Sigma) を 1~2% になるようにアセトンに溶解。
- ② スライドガラスをラックに入れ、APS 溶解液に 5~10 秒漬ける。
- ③ アセトンで軽く洗浄。
- ④ DEPC 処理蒸留水\*で洗浄。
- ⑤ フード内で一晩風乾する。

注意：DEPC 処理蒸留水：蒸留水に 0.1% DEPC (ジエチルピロカルボネート) を入れ、よくスターラーで攪拌、一晩放置後オートクレーブをかけておいたもので、RNase を失活させたもの。

【0039】

組織をスライドガラスに付着させた後、ただちに冷風で乾燥させる。

【0040】

## (4) 組織の保存

薄切後、4%パラホルムアルデヒドにより固定を行い、in situ ハイブリダイゼーションの工程に進んでもよいが、進まない場合には、30分以上冷風にて乾燥させ、スライドガラス用ラックに入れてビニールテープで密閉し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存する。

薄切した後の余った組織は、カットした面にOCT compoundをのせ、組織の乾燥を防ぐ処理を施し、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保存する。

#### 【0041】

##### (5) 組織の残存RNAの検討

いずれの組織でも、種々の操作により組織中のmRNAが破壊されてしまうため、残存しているRNAの評価が重要である。評価方法は、特殊染色による方法とin situ ハイブリダイゼーションによる方法に大別される。特殊染色による方法は、アクリジンオレンジやメチルグリーン/ピロリンY染色でmRNAを含むRNA全体を染色する。in situ ハイブリダイゼーションによる残存RNAの評価方法は、 $\beta$ -アクトチン、poly-A RNA、28 SリボゾームRNA (rRNA) に対するin situ ハイブリダイゼーションにより行う。RNA染色で陰性の場合には、その組織にはRNAが存在しないと判断され、in situ ハイブリダイゼーションには不適切な組織である。一方、RNA染色で陽性の場合でも、in situ ハイブリダイゼーションの処理が適切に行われなければ陽性所見を得ることはできない。例えば、プローブが標的mRNAに到達できない場合などが知られている。従って、in situ ハイブリダイゼーションの陽性コントロールは不可欠である。 $\beta$ -アクトチンはinternal controlとしてNorthern blotなどに用いられるが、細胞増殖などの状態によってその量に変化しやすい。mRNAのpoly Aに対するin situ ハイブリダイゼーションを行う時のプローブは、通常のプローブに比して、GC含量が極めて異なり、 $T_m$ 値も違ってくるため、in situ ハイブリダイゼーションの条件を変更して行わねばならない。このため、通常のin situ ハイブリダイゼーションと同時に行うことができず一般的でない。これに対し、28S rRNAはすべての細胞に広く分布しており、その産生量は極めて一定である。さらに、吉井らが用いた28S rRNAのオリゴプローブ(Yoshii A, et al., J Histochem Cytochem, 43:321-327, 1995)は種を越えて同じプローブの使用が可能であり、実験モデル動物からヒトまで同じプロト

コールでin situ ハイブリダイゼーションを行うことができる。

#### 【0042】

### 2. 2 In situ ハイブリダイゼーション

プローブおよび切片の処理について説明する。

#### 【0043】

#### (1) プローブの作製と標識法

##### (1-1) プローブの作製

プローブとして、二本鎖DNA (dsDNA)、オリゴヌクレオチド (約20～40塩基の長さ)、RNAプローブを用いることができる。

RNAプローブを作製するには、テンプレートを調製し、in vitro転写を行い、RNAプローブの精製と濃度の確認をするとよい。

#### 【0044】

テンプレートの調製には、(a)プラスミドをテンプレートとする場合、(b)プラスミドからのPCR産物をテンプレートとする場合、(c) cDNAからのPCR産物をテンプレートとする場合がある。(a)のプラスミドをテンプレートとする場合が一般的であるが、本発明者は(c)のやり方でも成功している。(a)の方法では、まず、プローブDNA断片をSP6、T3、T7などのプロモーターを持つプラスミドに組み込む (約3～4週間)。プラスミドDNAを制限酵素で切断して直鎖化する。次いで、RNaseフリーにするため、直鎖化プラスミドDNAをプロテイナーゼKで処理する。(c)の方法では、凍結組織からmRNAを抽出し、cDNAを合成する。上流または下流にRNAポリメラーゼのプロモーター配列を含むプライマーを用いて (アンチセンスとセンスとの両方のプローブを作製するため)、PCRを行う (約7～10日)。例えば、アンチセンスプローブ作製のための3'側プライマーの5'末端にT7プロモーター配列を組み込み、センスプローブ作製のための5'側プライマーの5'末端にT7プロモーター配列を組み込むとよい。

#### 【0045】

in vitro転写は、市販のキット (例えば、AmpliScribe™ T7 Transcription Kit (EPICENTRE TECHNOLOGIES))を用いて行うことができる。



反応産物 (RNAプローブ) の精製は、市販のキット (例えば、RNeasy minikit (QIAGEN)) を用いて行うことができる。

#### 【0046】

精製した反応産物の吸光度を測定して、RNA濃度を算出する。

#### 【0047】

##### (1-2) プローブの標識法

放射性標識法と非放射性標識法とがある。放射性標識法では、 $^{35}\text{S}$  が多用されている。非放射性標識法には、ハプテンであるジゴキシゲニン、ビオチンなどを標識する方法と、核酸の塩基であるチミンにUVを照射して二量体を形成させるT-Tダイマー法がある (Koji T, et al. Acta Pathol Jpn, 40: 793-807, 1990)。

#### 【0048】

ハプテン標識を行う場合、市販されているキットにより容易に行うことができる。dsDNAプローブの場合は、ランダムプライム法により (例えば、ベーリンガー社製のDIG DNA labeling Kit) ジゴキシゲニンを標識できる。オリゴヌクレオチドプローブの場合は、DNA Tailing Kit (ベーリンガー社製) を、RNAプローブの場合は、DIG-RNA Labeling Kit (ベーリンガー社製) を用いると、ジゴキシゲニンの標識は容易である。

#### 【0049】

標識できたかどうかは、メンブレン上で発色させて検討できる。すなわち、標識したプローブを10倍段階希釈し、大体、 $10\text{ ng}/\mu\text{l} \sim 1\text{ pg}/\mu\text{l}$  のものを用意する。それをナイロン (セルロース) メンブレンに $1\mu\text{l}$  ずつ滴下し乾燥させる。その後、in situ ハイブリダイゼーションで実際に発色させる方法を用いて (アルカリフォスファターゼまたはペルオキシダーゼ標識の抗ハプテン抗体を用いて) 発色させる。標識が十分であれば感度よく発色するはずである。全く発色しない場合、感度が悪い場合は、標識が不十分ということになる。その際、キットに陽性コントロールとして標識済みのものが入っているので、同時に染色して確認する。また、ジゴキシゲニン定量化ストリップ (ベーリンガー1669958) として、プローブがうまく標識できたかどうかを簡単にチェックできるものも市

販されている。標識するハプテンとして頻用されているものは、ビオチン、ジゴキシゲニンである。腎臓、肝臓、筋肉などは内因性のビオチンが多量に含まれており、新鮮凍結組織を使用する場合には、染色後のバックグラウンドを考慮するとジゴキシゲニンの方が好ましい。

#### 【0050】

また、プローブがうまく標識されているかどうかに加えて、センス・アンチセンスの核酸同士がきちんとハイブリダイゼーションを起しているかどうかは、dot hybridizationをメンブレン上で行って検討する。まず、未標識のセンスプローブの濃度希釈を作り、ナイロンメンブレンに滴下し乾燥させる。標識したアンチセンスプローブとハイブリダイゼーションをさせ、その後、後述の組織でのin situ ハイブリダイゼーションの時と同じように酵素抗体法を用いて発色させる。

#### 【0051】

##### (1-3) 組織の処理とハイブリダイゼーション

##### ①Rehydration

ASPコートのスライドグラスに張り付けた切片が $-80^{\circ}\text{C}$ に保存されている場合は、切片をスライドグラスボックスごと冷蔵庫から取り出した後、シールされたままのスライドグラスボックスを $37^{\circ}\text{C}$ の加温器に入れ、約60分間温めた後に開封する。スライドグラス・ラックに入れた後、PBSに3分間漬けて、rehydrationさせる。

#### 【0052】

##### ②固定

4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液にて、約15分間室温で組織切片を固定する。固定後、組織切片をPBSの入った染色バットに入れ、シェイカー上で振とうしながら、洗浄を3分間3回行う。

#### 【0053】

##### ③除蛋白

未処理の組織では、プローブの浸透性が十分でないため、組織の除蛋白処理が必要となることがある。ここでのプロトコールでは、除蛋白操作を塩酸とプロテ

イナーゼKとによって行う。まず、塩酸処理として、0.2N塩酸（蒸留水にて希釈）が入った染色バットに10～20分間室温にて浸す。その後、PBS洗浄を3分間3回シェイカー上で振とうしながら行う。次に、プロテイナーゼK（molecular biology use用）処理を行う。プロテイナーゼKの最終濃度を0.5 μg/ml/PBSとした溶液を作製し、前もって30分間37℃の水浴で温めておく。切片を37℃、5～15分間浸透し、その後PBSで3分間3回、シェーカー上で洗浄する。

#### 【0054】

##### ④後固定

除蛋白操作でゆるんだ組織を引き締める。特に、新鮮凍結切片の場合、形態の保持のために必要である。4%パラホルムアルデヒド/PBSで5～10分間室温にて組織切片を固定する。なお、後固定の後、PBSで洗浄し、標本に残っているアルデヒドを中和する目的で、2 mg/mlグリシン/PBSに15分間2回漬けてもよい。その後、洗浄を行う。

#### 【0055】

##### ⑤Pre-hybridization

室温で30分間（1時間以上になってもよい）、組織切片をpre-hybridization液（4×SSC/3×Denhardt's溶液/20%ホルムアミド）に浸す。この処理を行うことにより、hybridization液がなじみやすくなる。

#### 【0056】

##### ⑥Hybridization

Hybridization溶液（4×SSC/50 mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)/5×Denhardt's溶液/0.2 mg/mlサケ精巣DNA/0.2 mg/ml酵母tRNA/20%ホルムアミド/標識したプローブ）を作製し、煮沸後急冷し、組織切片に載せる。

プローブ濃度は、組織、プローブ、目的とする遺伝子によって異なるが、大体0.5～2 ng/μlの範囲で用いる。

dsDNAプローブの場合は、Hybridization溶液/プローブを煮沸する。これは、プローブの二次構造をなくすためである。オリゴヌクレオチドプローブの場合もHybridization溶液/プローブを煮沸した方がよい。具体的には、Hybridization溶液を入れた1.5 mlエッペンドルフチューブの蓋をして、ステンレス製の煮沸用

容器に入れ、蓋をして、5～7分間煮沸する。その後、直接、氷と水を入れた容器の中にエッペンドルフチューブを入れて、急冷する。その後、エッペンドルフチューブを氷の上に置いておく。

#### 【0057】

Pre-hybridization液に浸っているスライドグラスを取り出し、組織の回りの余分な溶液を拭き取る。この時に組織が乾燥しないように気をつける。組織が乾燥すると、非特異的なシグナルの原因となる。スライドグラス1枚あたり約30～70  $\mu$ lのhybridization溶液の載せ、よく攪拌する。

その後、hybridization溶液を載せたスライドグラスを湿箱に入れる。乾燥しないように蓋をして、ビニールテープで密閉する。37℃で一晩放置する。

#### 【0058】

##### ⑦Hybridization後の洗浄

密閉していた湿箱から、1枚ずつスライドを取り出し、洗浄液を入れた染色バットに入れる。下記の洗浄液で各々30分間2回、シェーカー上で洗浄する。

##### 洗浄液

2×SSC+0.075% Brij35 (23 Lauryl ether, Sigma)

0.5×SSC+0.075% Brij35

#### 【0059】

##### (1-4) Hybridizationしたプローブの可視化

放射性標識の場合は、オートラジオグラフィーを行う。非放射性標識の場合は酵素抗体法（抗ジゴキシゲニン抗体、抗ビオチン抗体を用いる）により、標的遺伝子（mRNA、DNA）とハイブリダイゼーションしたプローブを発色させる。ここでは、酵素抗体法によるシグナルの検出を説明する。

#### 【0060】

ジゴキシゲニンを標識している場合、抗ジゴキシゲニン抗体を用いるが、この場合、(a)ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いる方法、(b)アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いる方法、(c)マウス抗ジゴキシゲニン抗体を用いる方法の3つの方法がある。(a)と(b)の方法は直接法であり、(c)の方法は、さらにペルオキシダーゼまたはアルカリフォスファターゼ標

識の抗体を重ね合わせる間接法である。このうち、感度が最も高いのは(b)の方法であり、感度が最も低いのは(a)の方法である。(c)の方法でも良好な感度を得ることが可能である。

#### 【0061】

これ以降の工程は、RNaseのことを特に気にすることなく、通常の免疫化学染色と同じである。

まず、抗ジゴキシゲニン抗体の非特異的な組織への結合を防ぐ目的で、プレ・インキュベーションを行う。この時に用いるプレ・インキュベーション溶液は、ウシ血清アルブミン、一次抗体を作製した等物の血清、IgG（ウサギ抗体なら、正常ウサギ血清やIgG）を含むようにする。発色は、通常、ジアミノベンジジン（DAB）と過酸化水素とで行われるが、この段階でも種々の感度を上げる方法がある。例えば、 $\text{CoCl}_2$ と $\text{NiSO}_4 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ とを添加することにより感度を高めることができる。また、最近ではCatalyzed Signal Amplification (CSA system, DAKO)というキットも市販されており、この感度は極めて良好である。発色後、核染を行う。核染色は画像解析を行う場合には省いてもよいが、シグナル陰性の細胞を明らかにするためには行った方がよい。発色色素としてDABを用いた場合、DABでの発色は通常茶色であるので、核染色には核が緑色となるメチルグリーン染色を用いると見やすくよい。

#### 【0062】

表3にペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いる場合の操作手順を示す。

#### 【0063】

## 【表 3】

表3 Hybridization後の発色：ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いた場合

- ① Hybridizationの翌日、洗浄後、組織内のペルオキシダーゼをブロックするためにメタノールブロック。メタノール+0.3%過酸化水素水に20分間室温で浸す。アルミホイルで遮光しておく。その後PBSで洗浄。
- ② プレ・インキュベーション(正常ヒツジIgG/BSA/PBS)を湿箱、室温30分以上。
- ③ ペルオキシダーゼ標識ヒツジ抗ジゴキシゲニン抗体をプレ・インキュベーション溶液で50~200倍に希釈して組織切片上に滴下。湿箱で室温1時間以上から一晩反応。
- ④ 0.075% Brij 35/PBSで洗浄。5分、4回。
- ⑤ DAB、過酸化水素水との反応、核染、脱水、封入。

## 【0064】

アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いる場合、工程の数は少なくても済み、かつ感度が良好である。表4にアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いる場合の操作手順を示す。

## 【0065】

## 【表 4】

表4 Hybridization後の発色：アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を用いた場合

- ① Hybridization後、洗浄してから緩衝液1<sup>\*</sup>を載せる。5分。
- ② プレ・インキュベーション：1~1.5%ブロッキング溶液/緩衝液1、1時間。
- ③ 緩衝液1で500~2,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体を組織にのせ、反応。30分間~1時間。
- ④ 洗浄：緩衝液1で15~30分、2回、シェイカー上で。
- ⑤ 緩衝液2<sup>\*\*</sup>、3分間。
- ⑥ 発色液(NBT 6μl/ml + BCIP 3.5μl/ml + レバミゾール液<sup>\*\*\*</sup>/緩衝液2 1 ml)との反応。発色の程度を見ながら、反応を防止する<sup>\*\*\*</sup>。
- ⑦ 水洗し、脱水し、封入。このキットを用いた場合は水洗、脱水、封入しても色が落ちることはあまりない。アルカリフォスファターゼ発色を他の方法で発色させた場合は、水洗、脱水で容易に脱色するので、ごく軽く水洗し、組織上の水分を吸い取った後、乾燥させ、水溶性封入剤で封入する。

※1：100 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl

※2：100 mM Tris HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>

※3：組織上の非特異的なアルカリフォスファターゼによる発色を止めるために用いる。

DAKO社のものなどですでに溶解してあるものもある。

※4：実際の反応時間は5分間から12時間程度まで様々である。

## 【0066】

ここでは、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)と5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP)による発色を示してある。ベーリンガー製のDIG Nucleic Acid Detection Kitが便利である。

## 【0067】

以上の操作は、「In situ hybridization 技法」編集；小路武彦、学際企画に記載されているので、参照されたい。

## 【0068】

in situ ハイブリダイゼーションは、完全自動化を実現するペンタナHXシステム（ペンタナ社製）を用いて行ってもよい。この装置を用いることにより、短時間で再現性の良い結果を多量に得ることができる。

## 【0069】

以上の操作により、組織レベル、細胞レベルでのmRNA発現の局在化の様子を調べることができる。

## 【0070】

上記のようにして得られる遺伝子発現の局在化の情報は、疾患に関連する遺伝子の探索、クローン化した遺伝子またはESTの未知の機能の探索、ゲノム創薬に利用することができる。

## 【0071】

## 【実施例】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

## 【0072】

## [実施例1]

成熟マウス（雄、Bcl black、三共ラボサービスより購入）の両側総頸動脈を20分間結紮して血流を遮断し、脳虚血モデルとした。その後血流を回復してから経時的（0～24時間）に屠殺して海馬を取り出し、プロトコールに従って試料を作製し、Mu6,500 Oligonucleotide DNA Probeアレーを用い、アフィメトリックス社（米国）のGeneChipシステムにより遺伝子発現解析を行った。Mu6,500

0 Oligonucleotide DNA Probeアレーでは、6500種類のゲノムを同時に解析できた。このデータをもとに、バイオインフォマティクスを利用して（具体的には、LIMS-EDMTによるスキッタープロットを使って）、解析した結果を図1に示す。図1の横軸は虚血処理をしなかったマウスのゲノム発現量を示し、縦軸は虚血・再灌流24時間後のゲノム発現量を示す。図1の個々の点がそれぞれ特定されたゲノムに対応しており、発現量の増加したもの（例えば、\*1では、虚血前後に30から600に20倍程度発現が増加）、変化しなかったもの（例えば、\*2）、減少したもの（例えば、\*3では、虚血前後に7,000から70に約1/100発現が減少）を判定することができ、かつ特定の遺伝子の大きな組織内における発現量についても知ることができた。この結果、約1000種類の遺伝子について発現量の変動を認めた。公開遺伝子情報データベースと接続すれば、個々のゲノム情報がたちどころに得られる。

### 【0073】

#### 〔実施例2〕

成熟ラット（雄12週令、Wister系雄性ラット、三共ラボサービスより購入）の肝門部を15分間結紮して血流を遮断し、肝虚血モデルとした。その後血流を回復してから経時的（0～4時間）に屠殺して肝臓を取り出し、プロトコールに従って試料を作製し、Rat Toxicology U34アレイを用い、アフィメトリックス社（米国）のGeneChipシステムにより遺伝子発現解析を行った。Rat Toxicology U34アレイでは、約850種のラット遺伝子とESTを同時に解析できた。このデータをもとに、バイオインフォマティクスを利用して（具体的には、LIMS-EDMTによるスキッタープロットを使って）、解析した結果を図2に示す。図2の縦軸は虚血処理をしなかったラットのゲノム発現量を示し、横軸は虚血・再灌流4時間後のゲノム発現量を示す。図2の個々の点がそれぞれ特定されたゲノムに対応している。Hsc70およびTATase(Tyrosine aminotransferase)はその一例である。この結果、0時間と4時間を比較すると、約100種程度の遺伝子発現が2倍以上増加し、約40種程度の遺伝子発現が1/2以下に減少した。Hsc70とTATaseについては、GeneChipを用いた発現量においては、両遺伝子ともcontrol群、虚血処置群とも優位の変動は示していない。



【0074】

## 【実施例3】

controlラットおよび実施例2の肝虚血モデルラット（血流の回復から4時間経過後）から、それぞれ、肝臓を取り出し、新鮮凍結切片を用意した。HSC70 (Heat shock protein 70 like protein, NCBIのGenBank Accession No. M11942) の position 229-629 (400 bp) をジゴキシゲニンで標識したものをRNAプローブとして用い、ベンタナHXシステムで肝臓新鮮凍結切片のin situ ハイブリダイゼーションを行った。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に、in situ ハイブリダイゼーションの条件を表6に示す。

【0075】

【表5】

## HSC70(heat shock protein 70 like protein)

| No.    | Upper Primer                  | Position | Lower Primer                   | Position | Length |
|--------|-------------------------------|----------|--------------------------------|----------|--------|
| M11942 | CAATGAACCCCAACACAG<br>(配列番号1) | 229      | CTTCAGCCCCGACTTCTTA<br>(配列番号2) | 629      | 400bp  |

## HSP70

| No.    | Upper Primer                  | Position | Lower Primer                    | Position | Length |
|--------|-------------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------|
| L16764 | GCTGGTGGGCGGCTCGAC<br>(配列番号3) | 1182     | GCTCTGTCCGTGGCCGTGAC<br>(配列番号4) | 1659     | 478bp  |

## TATase

| No.    | Upper Primer                     | Position | Lower Primer                    | Position | Length |
|--------|----------------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------|
| X02741 | GAAGAAAGAAAGGCAGGAAGG<br>(配列番号5) | 192      | CTTGGAATGAGGATGTTTGT<br>(配列番号6) | 594      | 403bp  |

## c-jun

| No.    | Upper Primer                    | Position | Lower Primer                    | Position | Length |
|--------|---------------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------|
| x17163 | TGAAGCAGAGCATGACCTTG<br>(配列番号7) | 453      | AGTTGCTGAGGTTGGCGTAG<br>(配列番号8) | 878      | 426bp  |

## EST 1

| No.      | Upper Primer                    | Position | Lower Primer                     | Position | Length |
|----------|---------------------------------|----------|----------------------------------|----------|--------|
| AA818604 | GCCATCTCCTTCATCTTGGT<br>(配列番号9) | 147      | GACTTGGGCACCACCTACTC<br>(配列番号10) | 511      | 365bp  |

## EST 2

| No.      | Upper Primer                     | Position | Lower Primer                    | Position | Length |
|----------|----------------------------------|----------|---------------------------------|----------|--------|
| AI103915 | TGGGCTCAAAGCCATATTTG<br>(配列番号11) | 183      | CCGAAGCTAGAGCCACCAG<br>(配列番号12) | 585      | 403bp  |

【0076】

【表 6】

| Step   | Reagent  | Temp. | Time            |
|--|--|-------|-----------------|
| Off line   |  |       |                 |
| Fixation   | 4%PFA/PBS  | R.T.  | 30min           |
| Wash   | PBS  | R.T.  | 5min x 2 times  |
| DEPC treatment                                   | 0.1%DEPC/PBS   | R.T.  | 15min x 2 times |
| Wash   | PBS  | R.T.  | 1min            |
|  | H <sub>2</sub> O   | R.T.  | 1min            |
| Acid treatment                                   | 0.2M HCl   | R.T.  | 20min           |
| Wash   | H <sub>2</sub> O   | R.T.  | 1min            |
|  | PBS  | R.T.  | 3min x 3 times  |
|  | 5x SSC   | R.T.  | 30min           |
| Probe  | App.200uL<br>50% FA, 5x SSC, 5x Denhardt's,<br>500ug/ml ssDNA, 250ug/ml t-RNA, 1mM DTT |       |                 |
| Denaturation                                     |  | 65°C  | 15min           |
| Hybridization                                    |  | 57°C  | 14hrs           |
| Stringency Wash 1 <sup>st</sup> -2 <sup>nd</sup> | 2x SSC   | 55°C  | 6min x 2 times  |
| 3 <sup>rd</sup> -4 <sup>th</sup>                 | 0.1x SSC   | 55°C  | 16min x 2 times |
| Antibody Blocking                                | Protein Brock Serum-Free   | 37°C  | 20min           |
| Antibody   | x2000 anti DIG-AP  | 37°C  | 46min           |
| Wash   | TBS  | R.T.  | 10min x 3 times |
|  | APB  | R.T.  | 5min            |
| Detection  | BM-Purple  | R.T.  | 6hrs~           |

## 【0077】

controlラットの結果を図3に、肝虚血モデルラットの結果を図4に示す。図中、Anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。図3と4を比較すると、肝虚血モデルラットの肝臓組織では、中心静脈（図4の穴の部分）の回りがよく染色されており（HSC70の発現が多い）、遠くになるにつれ、染色が薄くなっている（HSC70の発現が少なくなっている）ことがわかる。このことから、HSC70については、中心静脈の回りに虚血の影響が出ていると言える。

## 【0078】

## [実施例4]

HSC70プローブの代わりにTATaseプローブを用いて、実施例3と同様の手順で、in situ ハイブリダイゼーションを行った。TATaseプローブとしては、TATase

(NCBIのGenBank Accession No. X02741)のposition 192-594 (403 bp)をジゴキシゲニンで標識したものを用いた。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に示す。in situ ハイブリダイゼーションの条件は表6に示した通りである。

controlラットの結果を図5に、肝虚血モデルラットの結果を図6に示す。図中、Anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。図5と6を比較すると、肝虚血モデルラットの肝臓組織では、中心静脈（図6の穴の部分）の回りがよく染色されており（TATaseの発現が多い）、遠くになるにつれ、染色が薄くなっている（TATaseの発現が少なくなっている）ことがわかる。このことから、TATaseについては、中心静脈の回りに虚血の影響が出ていると言える。

Hsc70とTATaseについて、GeneChipを用いた発現量においては、両遺伝子ともcontrol群、虚血処置群とも優位の変動は示していないが、in situ ハイブリダイゼーションにおいては、虚血処置により中心動脈のまわりの発現量が上昇していることがわかる。さらに、その変化については、TATaseにより顕著に現れていることがわかる。この様に、GeneChipとIn situ ハイブリダイゼーションを組み合わせることで、より多くの遺伝子の情報を得ることができる。

#### 【0079】

##### 〔実施例5〕

成熟ラット（雄、Wister京都、12週令、三共ラボサービスより購入）の両側体温と脳温を37℃に保ち、両側総頸動脈を10分間結紮して血流を遮断し、さらに血圧を30～40mmHgに降下させて、脳虚血モデルとした（通称、Smithの脳虚血モデル）。10分後に再灌流し、脳温および体温を37℃に保った。2時間後に屠殺して海馬を取り出し、プロトコールに従って試料を作製し、ラットU34アレーを用い、アフィメトリックス社（米国）のGeneChipシステムにより遺伝子発現解析を行った。ラットU34アレーでは、3万4千種類のゲノムを同時に解析できた。このデータをもとに、バイオインフォマティクスを利用して（具体的には、LIMS-EDMTによるスキャッタープロットを使って）、解析した結果を図7に示す。図7は、Control群と虚血後2時間の3万4千個の遺伝子の変化につ

いてScatter plotを行った図である。図7の横軸は虚血処理をしなかったラット (control) のゲノム発現量を示し、縦軸は虚血・再灌流2時間後のゲノム発現量を示す。図7の個々の点がそれぞれ特定されたゲノムに対応している。HSC70、HSP70、c-jun、EST1およびEST2はその一例である。X=Yの直線上にある点に相当する遺伝子は、処置前後で変化がなかったことを示している。この結果、0時間と2時間を比較すると、約475種程度の遺伝子発現が2倍以上増加し、約486種程度の遺伝子発現が1/2以下に減少した。HSC70は虚血前後で変化がなかった (Intensityの変化 Control\*0H: 約30,000→ischemia\*2H: 約30,000)。HSP70は、虚血前後で約20倍ほど発現の上昇をみた (Intensityの変化 Control\*0H: 約1,000→ischemia\*2H: 約20,000)。c-junは、虚血前はあまり発現していないが、虚血後は、劇的にその発現が上昇した (Intensityの変化 Control\*0H: 約0.1→ischemia\*2H: 約20,000)。EST1は、虚血前はあまり発現していないが、虚血後は、劇的にその発現が上昇した (Intensityの変化 Control\*0H: 約3,000→ischemia\*2H: 約15,000)。EST2は、虚血前後で約5倍ほど発現の上昇をみた (Intensityの変化 Control\*0H: 約3,000→ischemia\*2H: 約15,000)。

#### 【0080】

##### 〔実施例6〕

controlラットおよび実施例5の脳虚血モデルラット (血流の回復から2時間経過後) から、それぞれ、脳を取り出し、新鮮凍結切片を用意した。HSP70 (Heat shock protein 70 like protein, NCBIのGenBank Accession No. L16764) のposition 1182-1659 (478 bp) をジゴキシゲニンで標識したものをRNAプローブとして用い、ベンタナHXシステムで肝臓新鮮凍結切片のin situ ハイブリダイゼーションを行った。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に示す。in situ ハイブリダイゼーションの条件は表6に示した通りである。

controlラットおよび脳虚血モデルラットの結果を図8に示す。図中、anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。HSP70は、脳全体に、びまん性に発現が上昇している。特に海馬においては、その発現が著しく上昇している。これは、GeneChipのデータと一致しているので、GeneChipのデータをうらずけることができる。

## 【0081】

## [実施例7]

HSP70プローブの代わりにc-junプローブを用いて、実施例6と同様の手順で、in situ ハイブリダイゼーションを行った。c-junプローブとしては、c-jun (NCBIのGenBank Accession No.X17163)のposition 453-878 (426 bp)をジゴキシゲニンで標識したものを用いた。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に示す。in situ ハイブリダイゼーションの条件は表6に示した通りである。

controlラットおよび脳虚血モデルラットの結果を図9に示す。図中、anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。c-junは、脳全体に、びまん性に発現が上昇している。これは、発現のなかったものが、虚血によって急激に上昇するという点でGeneChipのデータと一致しているので、GeneChipのデータを裏付けることができる。

## 【0082】

## [実施例8]

HSP70プローブの代わりにEST1プローブを用いて、実施例6と同様の手順で、in situ ハイブリダイゼーションを行った。EST1プローブとしては、EST1 (NCBIのGenBank Accession No.AA818604)のposition 147-511 (365 bp)をジゴキシゲニンで標識したものを用いた。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に示す。in situ ハイブリダイゼーションの条件は表6に示した通りである。

controlラットおよび脳虚血モデルラットの結果を図10に示す。図中、anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。

また、controlラットおよび脳虚血モデルラットの結果を拡大したものを図11に示す。

EST1は、脳の海馬においては、低倍率では、歯状回や脳室の脈絡層に濃染をみとめる。250倍、500倍に検鏡倍率を上げてみると、虚血前は発現していないが、虚血後は、血管の内皮細胞が著名に濃染されていることがわかる。こういった

ように、脳の分布のみならず、組織内の細胞種の違いも特定することも可能である。

### 【0083】

#### 【実施例9】

HSP70プローブの代わりにEST2プローブを用いて、実施例6と同様の手順で、*in situ* ハイブリダイゼーションを行った。EST2プローブとしては、EST2 (NCBIのGenBank Accession No. AI103915)のposition 183-585 (403 bp)をジゴキシゲニンで標識したものをを用いた。RNAプローブの作製に用いたプライマーの配列を表5に示す。*in situ* ハイブリダイゼーションの条件は表6に示した通りである。

controlラットおよび脳虚血モデルラットの結果を図12に示す。図中、anti-senseとはアンチセンスプローブで染色した結果を示し、senseとはセンスプローブで染色した結果を示す。EST2は、脳において、虚血前後で海馬錐体細胞の濃染を認め、発現の上昇を示唆した。

### 【0084】

#### 【発明の効果】

本発明の遺伝子スクリーニング方法は、生体組織における遺伝子および／または発現遺伝子配列断片の局在化という新たな観点から、遺伝子の選別を行うという画期的なものであり、目的とする遺伝子の絞り込みに有効である。

### 【0085】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Nihon University

<120> A method for screening genes

<130> P01-006

<140>

<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 1

caatgaaccc caccaacaca g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

ctttcagccc cgacttctta

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

gctggtgggc ggctcgac

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

gctcttgtcc gtggccgtga c

21

<210> 5

<211> 21



<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gaagaaagaa aggcaggaag g

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

cttggaatga ggatgttttg t

21

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

tgaagcagag catgaccttg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

agttgctgag gttggcgtag

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

gcgatctcct tcattcttggt

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

gacttgggca ccacctactc

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

tgggctcaaa gccatatttc

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12

ccgaactcta gagccaccag

20

【0086】

【配列表フリーテキスト】

【配列番号1】

配列番号1は、HSC70のposition 229-629の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

【0087】

【配列番号2】

配列番号2は、HSC70のposition 229-629の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

【0088】

【配列番号3】

配列番号3は、HSP70のposition 1182-1659の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

【0089】

【配列番号4】

配列番号4は、HSC70のposition 1182-1659の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

【0090】

【配列番号5】

配列番号5は、TATaseのposition 192-594の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

【0091】

**【配列番号 6】**

配列番号 6 は、TATaseのposition 192-594の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

**【0092】****【配列番号 7】**

配列番号 7 は、c-junのposition 453-878の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

**【0093】****【配列番号 8】**

配列番号 8 は、c-junのposition 453-878の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

**【0094】****【配列番号 9】**

配列番号 9 は、EST1のposition 147-511の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

**【0095】****【配列番号 10】**

配列番号 10 は、EST1のposition 147-511の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

**【0096】****【配列番号 11】**

配列番号 11 は、EST2のposition 183-585の配列をターゲットとする上流プライマーの塩基配列を示す。

**【0097】****【配列番号 12】**

配列番号 12 は、EST2のposition 183-585の配列をターゲットとする下流プライマーの塩基配列を示す。

**【図面の簡単な説明】****【図 1】**

脳虚血モデルマウスの血流の回復直後から24時間経過後の種々の遺伝子および発現遺伝子配列断片の海馬における発現量の変化を示す。

#### 【図2】

肝虚血モデルラットの血流の回復直後から4時間経過後の種々の遺伝子および発現遺伝子配列断片の肝臓における発現量の変化を示す。

#### 【図3】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの肝臓組織におけるHsc70発現の分布を解析した結果を示す。

#### 【図4】

in situ ハイブリダイゼーションにより、肝虚血モデルラットの血流回復から4時間経過後の肝臓組織におけるHsc70発現の分布を解析した結果を示す。

#### 【図5】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの肝臓組織におけるTATase発現の分布を解析した結果を示す。

#### 【図6】

in situ ハイブリダイゼーションにより、肝虚血モデルラットの血流回復から4時間経過後の肝臓組織におけるTATase発現の分布を解析した結果を示す。

#### 【図7】

脳虚血モデルラットの血流の回復直後から2時間経過後の種々の遺伝子および発現遺伝子配列断片の脳における発現量の変化を示す。HSC70、HSP70、c-jun、EST1およびEST2の発現量の変化を明示した。

#### 【図8】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの脳組織および脳虚血モデルラットの血流回復直後の脳組織におけるHSP70発現の分布を解析した結果を示す。

#### 【図9】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの脳組織および脳虚血モデルラットの血流回復から2時間経過後の脳組織におけるc-jun発現の分布を解析した結果を示す。

## 【図10】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの脳組織および脳虚血モデルラットの血流回復から2時間経過後の脳組織におけるEST1発現の分布を解析した結果を示す。

## 【図11】

図10を拡大した図（×250、×500）である。

## 【図12】

in situ ハイブリダイゼーションにより、controlラットの脳組織および脳虚血モデルラットの血流回復から2時間経過後の脳組織におけるEST2発現の分布を解析した結果を示す。

A number of references have been cited in the specification, the entire disclosures of which are incorporated herein by reference. Priority benefits, under 35 U.S.C. 119, of Japanese Patent Application No. 2001-112367 filed April 11, 2001 are claimed and the entire disclosure of this priority application is incorporated herein by reference.

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNAチップ・DNAマイクロアレイ技術から得られる遺伝子発現情報とは異なる発現情報に基づいて、遺伝子のスクリーニングを行う方法を提供すること。

【解決手段】 遺伝子の発現産物であるmRNAおよび／または発現遺伝子配列断片に特異的にハイブリダイズするプローブを使用して、生体組織または細胞試料のin situ ハイブリダイゼーションを行い、前記組織または細胞における前記mRNAおよび／または発現遺伝子配列断片の局在化を調べることにより、遺伝子のスクリーニングを行う方法。

【選択図】 図10